

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 1/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/62933
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Dezember 1999 (09.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01575		(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 28. Mai 1999 (28.05.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 24 641.2 2. Juni 1998 (02.06.98) DE 198 26 442.9 13. Juni 1998 (13.06.98) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMTOX GMBH [DE/DE]; Gustav-Meyer-Allee 25, D-13355 Berlin (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WALLUKAT, Gerd [DE/DE]; Wolkensteinstrasse 4, D-13129 Berlin (DE). SCHNEIDER, Gisbert [DE/DE]; Blauenstrasse 15, D-79639 Grenzach-Wyhlen (DE). SCHRÖDL, Wieland [DE/DE]; Rosenthaler Strasse 17, D-10119 Berlin (DE). MÜLLER, Johannes [DE/DE]; Güntzelstrasse 63, D-10717 Berlin (DE). RÖNSPECK, Wolfgang [DE/DE]; Mainzer Strasse 25, D-10715 Berlin (DE). WREDE, Paul [DE/DE]; Reichensteiner Weg 7, D-14195 Berlin (DE). KUNZE, Rudolf [DE/DE]; Hessenhagen 2, D-17268 Stegelitz (DE).			
(54) Title: RATIONALLY DESIGNED PEPTIDES, PRODUCTION AND USE THEREOF			
(54) Bezeichnung: RATIONAL DESIGNTE PEPTIDE, IHRE HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG			
(57) Abstract <p>The invention relates to rationally designed peptides and to the production and use thereof for biotechnological, medical, diagnostic and therapeutic purposes. The method for generating peptides that are suitable for bonding auto-antibodies is characterized by the following: identification of a seed peptide with the suitable activity, production of a small number of peptide variants from the physico-chemical area around the seed peptide using a computer-assisted calculation method; synthesis and testing of the activity of said peptide variants; modelling of a quantitative sequence/activity ratio by means of an artificial neuronal network; and the production of peptides by simulated evolution in the sequence area using the trained neuronal network. The invention specifically relates to the peptide DRFGDKIAF.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft rational designte Peptide, ihre Herstellung und ihre Verwendung zu biotechnischen, medizintechnischen, diagnostischen und therapeutischen Zwecken. Das Verfahren zur Generierung von Peptiden, die zur Bindung von Autoantikörpern geeignet sind, ist gekennzeichnet durch Identifizierung eines Saatpeptids mit der geeigneten Aktivität; Erzeugung einer kleinen Auswahl von Peptidvarianten aus dem physikochemischen Raum um das Saatpeptid herum mit Hilfe eines computergestützten Rechenverfahrens; Synthese und Testung der Aktivität dieser Peptidvarianten; Modellierung einer quantitativen Sequenz/Aktivitäts-Beziehung mittels eines artifiziellen neuronalen Netzwerks; und Generierung von Peptiden durch simulierte Evolution im Sequenzraum mittels des trainierten neuronalen Netzwerks. Insbesondere handelt es sich um das Peptid DRFGDKIAF.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Rational designte Peptide, ihre Herstellung und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft rational designte Peptide, ihre Herstellung und ihre Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Die Reindarstellung von Biochemikalien, insbesondere von Immunglobulinen, nimmt eine zentrale Rolle bei der Bereitstellung von immunologischem Handwerkszeug im Labor ein. Hierzu gehören insbesondere die Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern, die entweder im Tier oder in der Zellkultur erzeugt wurden. Die Verwendung solcher immunologischer Biochemikalien hat in den letzten Jahrzehnten extrem zugenommen, und mit einer weiteren Verbreitung dieser immunologischen Werkzeuge in Medizin und Forschung ist zu rechnen.

Ähnliches gilt für die Bindung und Elimination von Antikörpern, insbesondere Autoantikörpern, als therapeutisches Prinzip bei einer Reihe von Krankheiten. Eine Elimination von Immunglobulinen aus dem Blutplasma und der darin enthaltenen Autoantikörper aus therapeutischen Zwecken hat sich bei solchen Krankheitsbildern wie Lupus erythematodes (SLE), idiopathische Thrombozytopenie, Vaskulitiden und dilatative Cardiomyopathie (DCM) bewährt.

In jüngster Zeit wurden weitere Krankheiten identifiziert, bei denen Autoantikörpern gegen definierte Rezeptoren eine pathogenetische Bedeutung zukommt. Bei verschiedenen Krankheiten wurden rezeptoraktive Autoantikörper gefunden (Tab.1). Als biologisches Signal zum Nachweis der Autoantikörper wurde die Änderung der spontanen Schlagfrequenz von neonatalen Rattenherzmuskelzellen verwendet.

Der Tabelle 1 sind Krankheiten zu entnehmen, bei denen eine Beteiligung von Autoantikörpern gegen Rezeptoren diskutiert wird.

Tabelle 1

KRANKHEIT	REZEPTOR	*%AK+
1. Dilatative Cardiomyopathie (DCM)	β 1-adrenerg	> 80
2. Myocarditis (MC)	β 1-adrenerg	> 80
3. Chagas-Disease	β 1-adrenerg	100
4. Herzarrhythmien	β 1-adrenerg	> 70
5. Chagas-Disease	muskarinerg-2 (M2)	?
6. Dilatative Cardiomyopathie	muskarinerg-2 (M2)	?
7. allergisches Asthma	β 2-adrenerg	> 70
8. allergische Rhinitis	β 2-adrenerg	?
9. Hypertonie	α 1-adrenerg	30-40
10. Psoriasis vulgaris	α 1-adrenerg	ca. 80
11. Präeklampsie	AngiotensinII-AT1	> 80
12. maligne Hypertonie	AngiotensinII-AT1	?

*%AK+: Anteil von Antikörper-positiven Patienten mit der jeweiligen klinischen Diagnose.

Referenzen:

- zu 1. : Wallukat et al., Biomed.Biochem.Acta 1987, 8193, 634-9;
- zu 2. : Wallukat et al., Biomed.Biochem.Acta 1987, 8193, 634-9;
- zu 3. : Ferrari et al., J.Exp.Med. 1995, 182: 55-65;
- zu 4. : Wallukat et al., noch unveröffentlicht
- zu 5. : Ferrari et al., J.Exp.Med. 1995, 182: 55-65;
- zu 6. : Fu et al., J.Clin.Invest. 1993,91: 1964-8;
- zu 7. : Wallukat et al., J.Allerg.a.Clin.Immunol.1991,88:581-7;

- zu 8. : Wallukat et al., J.Allerg.a.Clin.Immunol.1991,88:581-7;
- zu 9. : Fu et al., Lancet 1994, 3440: 1660-3;
- zu10. : Wallukat et al.,CongressAbstr.,J.Molec.Cell.1998 im Druck;
- zu11. : Wallukat et al.,1998, im Druck;
- zu12. : Fu et al., 1998, Circulation Abstr. 94:4046

Obwohl man eine Reihe von Targets der im Blut solcher Patienten vorhandenen Autoantikörpern kennt, wird derzeit noch das gesamte Immunglobulin der Patienten aus dem Blutplasma und dem Körper entfernt, mit ihnen also auch die Autoantikörper.

Nach jüngst veröffentlichten Studien ist diese Elimination von Immunglobulinen und damit auch von Autoantikörpern effektiv und leistet einen erheblichen Beitrag zur Regeneration der autoimmunologisch betroffenen und geschädigten Organe und Gewebe, zur drastischen Reduktion von klinischen Symptomen, mitunter sogar zur Heilung der Patienten. Besonders gut dokumentiert ist der therapeutische Nutzen der Elimination von β 1-adrenerg wirkenden Autoantikörpern bei der Dilatativen Cardiomyopathie (DCM).

Das als Immunapherese bezeichnete Verfahren entfernt das gesamte Immunglobulin aus dem Körper bzw. dem Blutkreislauf. Hingegen könnten für die Entstehung der Krankheit oft nur kleine Teilmengen vom Immunglobulin des Körpers, sog. Target-spezifischen Autoantikörpern, eine Ursache der Krankheit zuzuschreiben sein.

Dies ist am besten bei der dilatativen Cardiomyopathie (DCM) untersucht. Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigten, daß insbesondere zwei Epitope auf extrazellulären Loops des β 1-adrenergen Rezeptors von Herzmuskelzellen an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind. Wenn der Organismus gegen diese Autoantikörper produziert, tragen diese offensichtlich kausal zur Entstehung der Krankheit bei. Somit ist ein therapeutischer Erfolg durch eine Immunadsorption auch zu erwarten, wenn spezifisch die daran beteiligten Autoantikörper mit β 1-adrenerger Wirkung entfernt würden.

Der Nachweis der pathologischen Autoantikörper erfolgt dabei in einem mikroskopischen biologischen Test an kultivierten, neonatalen, spontan kontrahierenden Rattenherzmuskelzellen. Deren Schlagfrequenz erhöht sich bei Anwesenheit von bestimmten β 1-Rezeptor-spezifischen Autoantikörpern.

Mit den gegenwärtig vorhandenen medizintechnischen Verfahren ist es jedoch noch nicht möglich, spezifisch die an der Pathogenese der Krankheiten beteiligten Autoantikörper zu entfernen. Dies ist der Fall, obwohl man in einigen dieser Fälle die Targets der Autoantikörper kennt bzw. beschrieben hat. Es handelt sich in diesen speziellen Fällen um Autoantikörper, die sich gegen Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen bestimmter Organe richten.

Die Erfindung hat das Ziel, neue zur Bindung und Entfernung von pathogenen Autoantikörpern geeignete Peptide bereitzustellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, ein effektives Verfahren zur Generierung solcher Peptide zu entwickeln.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Generierung von Peptiden, die zur Bindung von Autoantikörpern geeignet sind, ist durch die folgenden Schritte gekennzeichnet:

- Identifizierung eines Saatpeptids mit der geeigneten Aktivität,
- Erzeugung einer kleinen Auswahl von Peptidvarianten aus dem physikochemischen Raum um das Saatpeptid herum mit Hilfe eines computergestützten Rechenverfahrens,
- Synthese und Testung der Aktivität dieser Peptidvarianten,
- Modellierung einer quantitativen Sequenz/Aktivitäts-Beziehung mittels eines artifiziellen neuronalen Netzwerks und
- Generierung von Peptiden durch simulierte Evolution im Sequenzraum mittels des trainierten neuronalen Netzwerks.

Der physikochemische Raum, der sich in seiner Größe aus der Zahl der Aminosäuren des Peptids ergibt, repräsentiert nicht nur die Sequenzen "um das Saatpeptid herum", sondern den gesamten Sequenzraum.

Die Erfindung wird im folgenden am Beispiel der Dilatativen Cardiomyopathie (DCM) näher erläutert:

Die Aminosäuresequenzen der durch Autoantikörper erkannten Epitope auf den entsprechenden Rezeptoren sind bei der DCM im Detail bekannt. Es werden die natürlichen Sequenzen der betreffenden Rezeptorareale verwendet, um diese nach Festphasenkopplung zur Elimination der Autoantikörper aus dem Blutplasma zu verwenden.

Es wurde die natürliche Aminosäuresequenz (10 Aminosäuren; pos. 107-116: ARRC YNDPKC) oder Teilsequenzen davon vom Loop2 des β_1 -adrenergen Rezeptors als Ursprungs- oder Saatpeptid ausgewählt. Dieses Epitop enthält die autoimmunologisch relevante Struktur. Von ihr ist bekannt, daß sie Autoantikörper bindet, und wenn man in einem entsprechenden biologischen Testsystem dieses Peptid hinzufügt, kann man die Wirkung der im Testsystem vorhandenen Autoantikörper aufheben. Dieses Peptid ist auch Festphasen-gekoppelt wirksam, d. h. es erkennt und bindet aus Immunglobulinfraktionen von Patienten die entsprechenden β_1 -adrenerg wirkenden Autoantikörper.

Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der Autoantikörper erfüllt das natürliche Peptid diese Aufgabe nicht in vollem Umfang und hat im biologischen Test eine geringe Neutralisationskapazität der Autoantikörper.

Das Peptid aus der Loop2-Region des β_1 -adrenergen humanen Rezeptors war Ausgangspunkt für die Suchstrategie zur Auffindung eines Peptides mit höherer Antikörperbindungseffizienz. Überraschenderweise wurde eine Aminosäuresequenz identifiziert, die in der Natur nicht vorkommt bzw. in den entsprechenden Datenbanken noch nie beschrieben wurde.

Ausgehend vom Saatpeptid wurden mit Hilfe eines speziellen computergestützten Rechenverfahrens Varianten von Peptiden entwickelt, die bestimmten physikochemischen Gesetzmäßigkeiten gehorchen und entsprechend unterschiedliche Bindungseigenschaften gegenüber Autoantikörpern und Immunglobulinen haben.

Das Ausmaß der Bindung von Antikörpern an diese vom Computer vorgeschlagenen Peptide bzw. Aminosäuresequenzen wiederum bilden die Grundlage für die Berechnung von weiteren Peptiden, die die Bindung der Autoantikörper an die Peptide stufenweise optimieren.

Die Daten aus diesen Experimenten wurden wiederum nach vorgegebenen Optimierungskriterien verarbeitet. Im Ergebnis wurde eine Aminosäuresequenz berechnet, die, im Experiment geprüft, dem natürlichen Peptid überlegene Neutralisationseigenschaften gegenüber der biologischen, zellphysiologischen Wirkung von β_1 -adrenergen Autoantikörpern aufweist.

Erfindungsgemäß wurde das Peptid DRFGDKDIAF identifiziert, welches keinerlei Sequenzähnlichkeit mehr mit dem natürlichen Epitop (Loop2) hat und in dem eingesetzten zellbiologischen Test die Wirkung der Autoantikörper auf die Pulsationsfrequenz der Herzmuskelzellen effizient neutralisiert. Mit der Hilfe dieses Peptids gelingt die Bindung und Elimination der Loop2-spezifischen, β 1-adrenerg wirkenden Autoantikörper.

Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Beispiel

Schritt 1:

Erzeugung von fokussierenden synthetischen Peptidbibliotheken:

Ausgehend von einem Saatpeptid (im Fall des DCM-Projektes die Sequenz ARRCYNPKC) wird eine bestimmte Anzahl von Sequenzvarianten (DCM-Projekt: 90 Varianten) mittels eines festgelegten Algorithmus erzeugt: Jeder Aminosäurerest wird mit geeigneten physikochemischen Parametern beschrieben. Im Fall des DCM Saatpeptids waren dies die Eigenschaften 'Volumen' (1) und 'Hydrophobizität' (Libophobie) (2). Dies führt zu einer mehrdimensionalen numerischen Beschreibung von Peptiden, also zur Definition eines bestimmten chemischen Raumes. Die zu erzeugenden Varianten des Saatpeptids werden nun bevorzugt aus der engeren Umgebung des Saatpeptids im chemischen Raum entnommen, aber umfassen auch einige weit vom Saatpeptid entfernte Peptide. Die Sequenzen wurden so ausgewählt, daß deren Abstände zum Saatpeptid im chemischen Raum einer Gaußverteilung (oder einer anderen lokalisierten Verteilung) angenähert wird. Der rationale Ansatz dabei ist, daß Peptide mit einer ähnlichen oder sogar höheren Aktivität (Wirkung, Eigenschaft) in der unmittelbaren Nähe um das Saatpeptid im chemischen Raum erwarten werden können (3). Zudem ist eine Gaußverteilung von Peptiden sehr wichtig für den nächsten rechnergestützten Schritt des Designs, der Entwicklung von Sequenz-Wirkungsbeziehungen.

Schritt 2:

Synthese und Test der neuen Peptidvarianten:

Die in Schritt 1 erzeugten neuen Peptide werden mit einem geeigneten Testverfahren auf ihre Aktivität (Wirkung, gewünschte Eigenschaft) untersucht. Im Fall des DCM-Projekts

war dies ein ELISA System, welches die Bindung von Peptiden an humane Antikörper gegen den $\beta 1$ -adrenergen Rezeptor messen konnte. Abbildung 1 zeigt das Ergebnis: Mit steigendem Abstand (Euklidisches Distanzmaß) vom Saatpeptid sinkt die mittlere Aktivität der Peptidvarianten. Zwei Besonderheiten sind zu finden, einmal liegt die mittlere Aktivität der dem Saatpeptid eng benachbarten Peptide über derjenigen des Saatpeptids, zum anderen gibt es weit entfernt vom Saatpeptid wiederum signifikante Aktivitäten. Diese Beobachtung bestätigt den wissensbasierten Ansatz und das Verfahren für die systematische Erzeugung von Peptidbibliotheken: Mehrere nicht-natürliche Peptide mit einer im Vergleich zum Saatpeptid erhöhten Fähigkeit, Antikörper zu binden, wurden gefunden.

Schritt 3:

Entwicklung von Sequenz-Wirkungsbeziehungen:

Um eine weitere systematische Suche im Raum aller möglichen Sequenzen nach Peptiden mit einer gewünschten Antikörperbindungseigenschaft zu ermöglichen, werden Sequenz-Wirkungsbeziehungen modelliert. Hierfür werden insbesondere künstliche neuronale Netze eingesetzt. Die in Schritt 1 erzeugten und in Schritt 2 getesteten Peptide zusammen mit dem Saatpeptid werden dazu mit geeigneten physikochemischen Parametern numerisch beschrieben (siehe Schritt 1). Mit Hilfe des neuronalen Netzes wird ein mathematischer Zusammenhang zwischen der Eigenschaftsbeschreibung der Peptide und deren gemessenen Aktivität hergestellt. Dies ist ein Optimierungsprozeß, der eingehend in der Literatur beschrieben ist (4,5). Die Berücksichtigung sowohl von Peptiden mit hoher Aktivität als auch inaktiver Peptide in diesen Prozeß ist notwendig für eine sinnvolle Modellierung. Die definierte Auswahl von Peptiden in Schritt 1 erfüllt diese Voraussetzung. Im DCM-Projekt lag der Fehler der modellierten Sequenz-Wirkungsbeziehung für die Trainingdaten bei nur 15%, in der Kreuzvalidierung bei 17%. Diese Werte entsprechen den Meßfehlern in Schritt 2. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, daß das neuronale Netz einen sinnvollen mathematischen Zusammenhang zwischen einer Aminosäuresequenz und deren Eigenschaft, Antikörper zu binden, hergestellt hat.

Schritt 4:

Rechnergestützte Suche nach neuen Peptiden mit gewünschten Eigenschaften:

Das in Schritt 3 optimierte neuronale Netz wird als Gütefunktion zur rechnergestützten systematischen Suche im Sequenzraum (Menge aller möglichen Peptide einer vorgegebenen

Länge) verwendet. Ein evolutionärer Algorithmus wird als Suchstrategie verwendet (diese Methode ist in der Literatur beschrieben (6)). Das Prinzip ist folgendes: In einem iterativen Prozeß werden vom Rechnerprogramm neue Varianten eines Elternpeptids erzeugt, anschließend mit Hilfe des neuronalen Netzes (siehe Schritt 3) alle Varianten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Antikörper zu binden, bewertet, und die beste(n) Peptidvariante(n) werden als Elternpeptide für den nächsten Zyklus ausgewählt. Im DCM-Projekt erhielten wir die Sequenz DRFGDKDIAF als Ausgabe des Rechnerprogramms. Für dieses Peptid berechnete das neuronale Netz die höchste Aktivität. Die Sequenz weist in nur zwei Positionen (Arginin-2, Asparaginsäure-7) eine Identität mit dem ursprünglichen Saatpeptid (siehe Schritt 1) auf. 73% aller potentiell stark an Antikörper bindende Peptide haben den Asp-7 Rest gemäß der Vorhersage des neuronalen Netzes, 17% haben ein Asparagin in Position 7. Das System kann auch dazu verwendet werden, Peptide zu erzeugen, die eine bestimmte Eigenschaft nicht aufweisen, also keine Antikörper binden. Die Sequenz FVRRTYYPER wurde als eine solche vom Rechnersystem vorgeschlagen.

Schritt 5:

Überprüfung der Aktivität der entworfenen (designten) Peptide in geeigneten Testsystemen, insbesondere Bioassays:

Die in Schritt 4 vom Rechner entworfenen Peptide werden bezüglich ihrer tatsächlichen biochemischen/biologischen Wirkung experimentell untersucht. Im Beispiel des DCM-Projektes bestand dieser Test in der Messung der Schlagrate von embryonalen Ratten-Myozyten mit und ohne Peptidzugabe in das Medium. Im Medium befanden sich die normale Schlagrate erhöhende humane Antikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor. Das genaue Testverfahren für das DCM-Projekt ist in der Literatur beschrieben (7). Das Ergebnis entsprach den Erwartungen und den Vorhersagen des Rechnerprogramms: Das Peptid DRFGDKDIAF war aktiv, d.h. die durch die pathogenen Antikörper erhöhte Schlagrate der Herzmuskelzellen wurde auf die normale Frequenz gedrückt, und das als nicht aktiv entworfene Peptid FVRRTYYPER zeigte keine meßbare Wirkung (Abbildung 2). Das Peptid DRFGDKDIAF wies deutlichere Effekte auf als das natürliche Antigen des β_1 -adrenergen Rezeptors bei allen verwendeten Peptidkonzentrationen (10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$). Bei der Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ hatte das natürliche Antigen nur noch sehr schwache Wirkung (nur 10% der normalen Aktivität der Myokardzellen wurde beobachtet), während das erfindungsgemäß designte Peptid in der Lage war, 50% der Normalaktivität der Myokardzellen wiederherzustellen.

Literatur:

1. Harpaz, Y., Gerstein, M., Chothia, C. (1994) *Struture* 2, 641-649
2. Engelmann, D. A., Steitz, T. A., Goldman, A. (1986) *Annu. Rev. Biosphys. Chem.* 15, 321-353.
3. Eigen, M., McCaskilly und Schuster, P., (1988) *J. Phys. Chem.*, Vol. 92, 6881.
4. Schneider. G., Wrede P. (1993) *J. Mol. Evol.* 36, 586-595.
5. Schneider. G., Wrede P. (1998) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, im Druck.
6. Schneider. G., Wrede P. (1994) *Biophys. J.* 66, 335-344,
Schneider. G., Schuchhardt, J., Wrede P. (1995) *Biophys. J.* 68, 434-447,
7. Wallukat, G., Wollenberger, A., Morwinski, R., Pitschner, H.-F. (1995) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 397-406.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Generierung von Peptiden, die zur Bindung von Autoantikörpern geeignet sind,
gekennzeichnet durch folgende Schritte
 - Identifizierung eines Saatpeptids mit der geeigneten Aktivität,
 - Erzeugung einer kleinen Auswahl von Peptidvarianten aus dem physikochemischen Raum um das Saatpeptid herum mit Hilfe eines computergestützten Rechenverfahrens,
 - Synthese und Testung der Aktivität dieser Peptidvarianten,
 - Modellierung einer quantitativen Sequenz/Aktivitäts-Beziehung mittels eines artifiziellen neuronalen Netzwerks und
 - Generierung von Peptiden durch simulierte Evolution im Sequenzraum mittels des trainierten neuronalen Netzwerks.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung des Saatpeptides durch Bestimmung von Teilsequenzen der nativen Gesamtsequenz erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Erzeugung der kleinen Auswahl von Peptidvarianten nach Beschreibung von physikochemischen Parametern jeder Aminosäure einzeln und in ihrer Wechselwirkung zu den benachbarten Aminosäuren mittels eines Algorithmus erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 zur Generierung von Peptiden zur Bindung von krankheitsspezifischen Autoantikörpern.
5. Verfahren nach Anspruch 1 zur Generierung von Peptiden mit Antikörper-neutralisierender Wirkung in Rezeptor-spezifischen zellbiologischen Tests.
6. Verfahren zur Generierung von Peptiden, die zur Bindung von β 1-adrenerg wirkenden Autoantikörpern geeignet sind,
dadurch gekennzeichnet, daß
 - die natürliche Aminosäuresequenz ARRCYNPKC vom Loop 2 des β -adrenergen Rezeptors oder Teilsequenzen von ihr als Saatpeptid eingesetzt wird,

- die Eigenschaften 'Volumen' und 'Hydrophobizität' jedes Aminosäurerestes zur Definition des chemischen Raums um das Saatpeptid herum verwendet werden,
- eine Auswahl von 50-120 Peptidvarianten aus diesem Raum analog zu einer Gaußverteilung erfolgt,
- diese Sequenzen synthetisiert und bezüglich ihrer β -adrenergen Aktivität getestet werden,
- die Modellierung einer quantitativen Sequenz/Aktivitätsbeziehung mittels eines an sich bekannten neuronalen Netzwerks erfolgt,
- mittels einer Suchstrategie mit dem Kriterium Antikörper-Bindungsfähigkeit weitere Sequenzen berechnet,
- ihre β -adrenerge Aktivität bestimmt und die aktivste Sequenz DRFGDKDIAF ermittelt wird.

7. Verwendung der nach Anspruch 1-6 generierten Peptide zu biotechnischen, medizintechnischen, diagnostischen und therapeutischen Zwecken.

8. Verwendung der gemäß Anspruch 1 bis 6 generierten Peptide zu biotechnischen, medizintechnischen und therapeutischen Zwecken zur Bindung und Elimination von Autoantikörpern bei Krankheiten, die mit rezeptor-, gewebs- oder organspezifischen Autoantikörpern assoziiert sind.

9. Verwendung der gemäß Anspruch 1 bis 6 generierten Peptide zu biotechnischen, medizintechnischen und therapeutischen Zwecken, zur Bindung und Elimination von Autoantikörpern bei dilatativer Cardiomyopathie, Myocarditis, Chagas Disease und Herzarrhythmien

10. Verwendung der gemäß Anspruch 1 bis 5 generierten Peptide zu biotechnischen, medizintechnischen und therapeutischen Zwecken, zur Bindung und Elimination von Autoantikörpern bei allergischem Asthma, allergischer Rhinitis, Hypertonie, Psoriasis vulgaris Präeklampsie und anderen Autoimmunerkrankungen, an denen Autoantikörper gegen relevante biologische Targets, wie z.B. Rezeptoren, beteiligt sind.

11. Verwendung von designten Peptiden gemäß Anspruch 7 bis 10 nach Matrixkopplung.

12. Verwendung von designten Peptiden gemäß Anspruch 7 bis 11 nach Derivatisierung und Ligandierung.

13. Verwendung von designten Peptiden gemäß Anspruch 7 bis 12 nach homologer oder heterologer Zyklisierung.

14. Verwendung von designten Peptiden gemäß Anspruch 7 bis 13 unter Nutzung von D- oder L- sowie D- und L-Aminosäuren.

15. Verwendung von designten Peptiden gemäß Anspruch 7 bis 14 in Verbindung bzw. Gemischen mit Peptiden aus natürlich vorkommenden Aminosäuresequenzen.

16. Peptid DRFGDKDIAF.

17. Verwendung des Peptids nach Anspruch 15 und 16 zur Bindung und Elimination von β 1-adrenerg wirkenden Autoantikörpern.

18. Verwendung des Peptids nach Anspruch 16 in Kombination mit weiteren natürlichen oder designten Peptiden nach Anspruch 15.

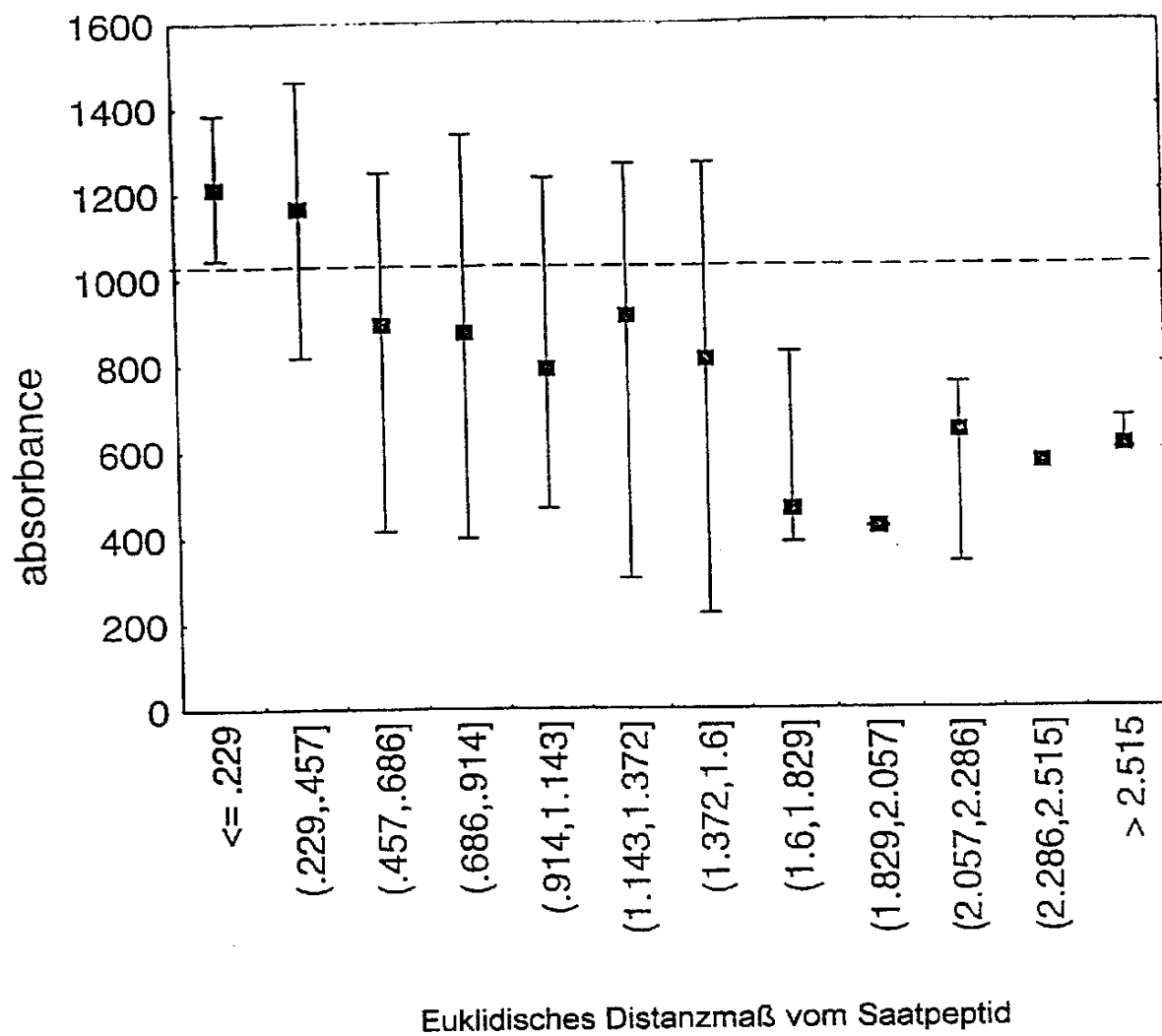
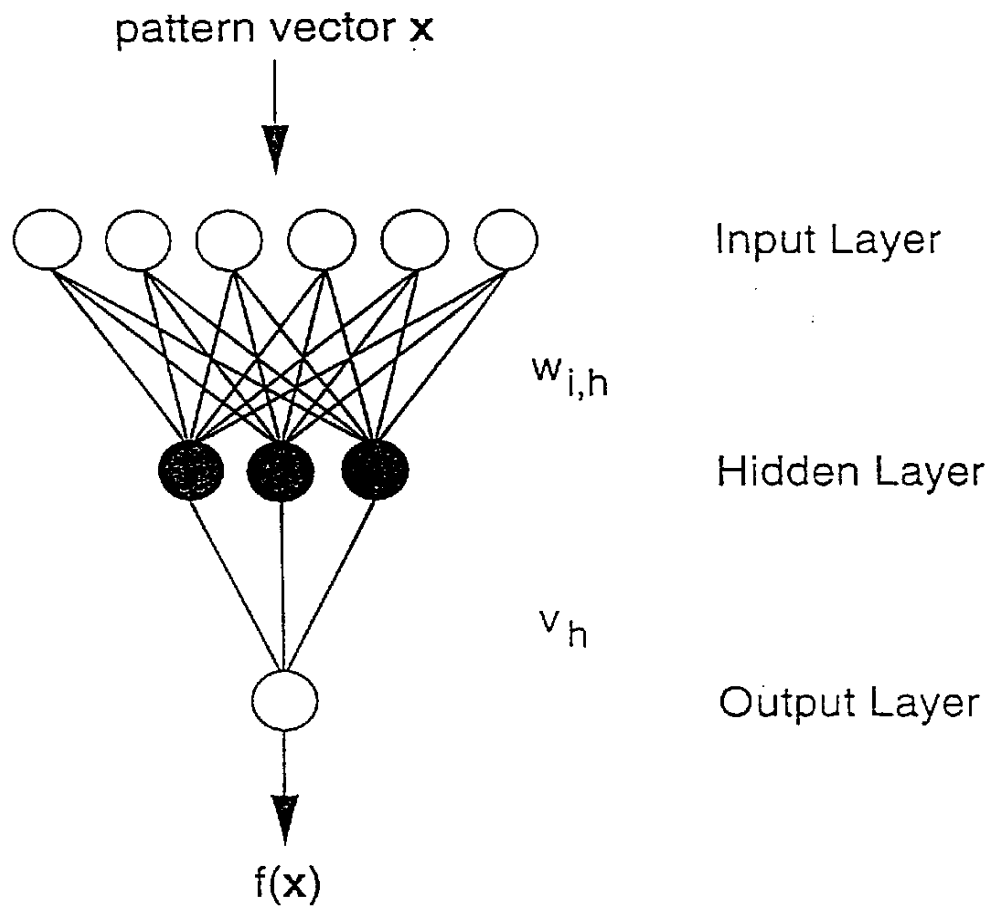


Abb. 1

*Abb. 2*